

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 09 NOV 2000

WIPO

PCT

4

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

DE 00/02924

[Handwritten signature]

Aktenzeichen:

199 41 416.5

10/070099

Anmeldetag:

31. August 1999

Anmelder/Inhaber:

Dr. Michael Niederweis, Erlangen/DE;
Dr. Stefan Bossmann, Karlsruhe, Baden/DE.

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Pro-
teins

IPC:

C 07 K, C 12 N

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 06. Oktober 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

[Handwritten signature]

Faust



1

Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins, ein kanalbildendes Protein, ein Gen und ein mutiertes mspA-Gen, einen Plasmidvektor und ein Überexpressionssystem.

Die Erfindung betrifft allgemein das technische Gebiet der Herstellung von Nanostrukturen. Zu den bisher am besten charakterisierten Nanostrukturen gehören Kohlenstoff-Nanokanäle (Yakobson, B. I. and Smalley, R. E. Fullerene nanotubes: C_{1,000,000} and beyond. *Am Sci* 85, 324, 1997). Mit Kohlenstoff-Nanokanälen konnte gezeigt werden, daß die elektronischen Eigenschaften durch ihre strukturellen Details kontrolliert werden. Die Synthese von Kohlenstoff-Nanokanälen erfolgt durch verschiedene Varianten von CVD (chemical vapor deposition) (Fan, S., Chapline, M. G., Franklin, N. R., Tomblor, T. W., Cassell, A. M. and Dai, H. Self-oriented regular arrays of carbon nanotubes and their field emission properties. *Science* 283, 512-4, 1999) und ist damit sehr aufwendig.

Aus Johnson, S. A., Ollivier, P. J. and Mallouk, T. E. Ordered mesoporous polymers of tunable pore size from colloidal silica templates. *Science* 283, 963-965 (1999) ist ein Verfahren zur Herstellung von organischen Nanokanälen auf der Grundlage eines Templates bekannt. Damit können Nanokanäle mit einem Durchmesser von 5 bis 35 nm hergestellt werden.

Mycobakterien gehören zu einer Untergruppe von Gram-positiven Bakterien, die Mycolsäuren besitzen und die die Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Dietzia* einschließen.

2

Trias, J. and Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 14, 283-290 (1994) beschreiben kanalbildende Proteine, nämlich Porine in der Mycolsäure-Schicht von Mycobakterien. Biochemische oder molekulargenetische Daten über diese Porine wurden bisher nicht veröffentlicht.

Aus Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Kramer, R. and Benz, R. Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* 37, 15024-32 (1998) ist ein Verfahren zur Präparation von Porinen aus Corynebakterien bekannt. Dieses Verfahren ist relativ ineffizient.

Mukhopadhyay, S., Basu, D. and Chakrabarti, P. Characterization of a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 179, 6205-6207 (1997) beschreiben die Extraktion von Porin aus *M. smegmatis* mit einem Puffer mit 1 % Zwittergent durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Ausbeuten waren schlecht und die Verunreinigung mit anderen Proteinen groß.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein einfaches und schnelles Verfahren mit verbesserter Ausbeute zur Herstellung kanalbildender Proteine angegeben werden. Die kanalbildenden Proteine sollen insbesondere zur Herstellung von Nanostrukturen geeignet sein.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 23 bis 31 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 22 sowie ggf. 27 und 28.

3

5 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins vorgesehen, wobei das kanalbildende Protein durch heterologe Expression oder durch Aufreinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.

10 Unter den kanalartigen Proteinen werden solche Proteine verstanden, die natürlicherweise insbesondere in der Zellwand der Gram-positiven Bakterien vorkommen.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich effizienter als die bisher beschriebenen Verfahren, bietet die Möglichkeit einer weitgehenden Automatisierung der chromatographischen Aufreinigung und ermöglicht eine drastisch erhöhte Ausbeute.

20 Das Gram-positive Bakterium kann ein mindestens eine Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein. Nach einer Ausgestaltung ist das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*.

25 Das kanalbildende Protein kann ein Porin sein. Bevorzugt wird ein Porin, das gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil und/oder bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C thermisch stabil ist.

Das Porin ist vorzugsweise MspA. Dieses Protein eignet sich wegen seinen überraschenden chemischen und thermischen Stabilität besonders gut zur Herstellung von Nanostrukturen.

30 Eine gut Ausbeute wird erzielt, wenn die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird. Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute kann das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen werden. Zweckmäßigerweise wird zur Expression ein für ein kanalbil-

4

dendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird. Vorteilhaft ist es weiter, daß zur Überexpression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 (siehe unten) benutzt wird. zur Expression kann insbesondere aber auch ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt werden, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht. Die Mutation kann auch im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierenden Gene bestehen. Zur Überexpression kann auch ein mutiertes mspA-Gen benutzt werden, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist. Die Anpassung der Codon-Benutzung verbessert die Überexpression von MspA in *E.coli* erheblich.

Durch Herstellung des kanalbildenden Proteins MspA aus *E. coli* kann die Ausbeute gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren zur Präparation des nativen Proteins noch einmal um den Faktor 10 bis 20 gesteigert werden.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 zu benutzen. Dazu kann ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet werden, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist. Solche geeigneten Vektoren sind z.B. von Hannig, G. und Makrides, S.C. in Trends in Biotechnology, 1998, Vol. 16, pp54 beschrieben. Der Offenbarungsgehalt dieses Dokuments wird hiermit einbezogen.

30

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, das kanalbildende Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien zu gewinnen. Die Detergentien können aus der folgenden Gruppe

5

ausgewählt sein: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)_n, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthiogluco-
 side, besonders Octylthiogluco-
 sid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldiamminoxid.

5 Es ist zweckmäßigerweise eine zweifache kritischer micellarer Konzentration (CMC) in einem Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.5, 150 mM NaCl) eingestellt worden. - Die zwitterionischen und nicht-ionischen Detergentien lösen insbesondere das kanalbildende Protein MspA sehr selektiv und
 10 mit guter Ausbeute aus der Zellwand von *M. smegmatis*.

Es hat sich weiter als zweckmäßig erwiesen, daß die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, und/oder die Extraktionszeit 5 bis
 15 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt. Vorteilhaft ist weiter die Benutzung eines Puffers mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat.

Insbesondere eine Durchführung der Extraktion bei 100 °C die
 20 Verwendung eines Puffers mit hoher Ionenstärke sowie zwitterionischer und nicht-ionischer Detergentien verbessern das Extraktionsverfahren für Porine aus *Mycobacterium smegmatis*. Es bietet gegenüber den bisherigen Verfahren zur Aufreinigung solcher Proteine mit Hilfe organischer Lösungsmittel oder der
 25 Extraktion bei Raumtemperatur folgende Vorteile:

- aa) Verzicht auf organische Lösungsmittel
- bb) geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen
- cc) effiziente Extraktion

30

Es ist auch möglich, MspA zur Aufreinigung in Dimethylsulfoxid bei einer Temperatur im Bereich von 50 - 110 °C zu lösen; danach kann die Lösung vom Rückstand getrennt und MspA durch Abkühlen ausgefällt werden.

Durch heterologe Expression gewonnenes MspA kann durch kann durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert werden. Zweckmäßig ist das Anlegen einer Spannung im Bereich von 50 V für
5 eine Zeit von etwa 30 Minuten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.
10

Das Gram-positive Bakterium kann ein Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein, wobei zweckmäßigerweise das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.

15 Von besonderem Vorteil ist es, daß das kanalbildende Protein ein Porin ist, das insbesondere gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist. Das Porin ist vorzugsweise bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil. Es kann sich dabei um das Porin MspA handeln.
20 Es ist aber auch denkbar, daß weitere hier nicht genannte Porine diese Eigenschaften aufweisen und damit vom Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Die erfindungsgemäßen kanalbildenden Proteine haben die folgenden Vorteile:
25

aaa) Sie lassen sich in organischen Lösungsmittel (z. B. CHCl₃/MeOH) lösen, ohne zu denaturieren. Die Fähigkeit zur Kanalbildung bleibt in organischen Lösungsmitteln erhalten.
30

bbb) Sie lassen sich mit Aceton fällen, ohne zu denaturieren.

ccc) Sie überstehen selbst Kochen in Detergentien (z. B. 10 min in 3% SDS), ohne zu denaturieren.

Diese extreme Stabilität der erfindungsgemäßen Proteine gegenüber chemischer und thermischer Denaturierung ermöglicht deren Verwendung zur Herstellung von technisch verwertbaren Nanostrukturen:

Nach Maßgabe der Erfindung wird weiterhin beansruht ein Gen kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien. Das Gen kann das mspA-Gen gemäß Sequenz 1 sein.

Als weiterer Gegenstand kommt auch ein mutiertes mspA-Gen in Betracht, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht. Die Mutation kann im wesentlichen darin bestehen, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist. Die Mutation kann aber auch so ausgebildet sein, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen der von MspA entspricht. Weitere hier nicht genannte Mutationen sind für den Fachmann ebenfalls denkbar. Gene, die zur Ausbildung der erfindungsgemäßen kanalartigen Proteine führen, sind vom beanspruchten Schutzzumfang umfaßt. Z.B. ein mutiertes mspA-Gen, wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 (siehe unten) ist.

Nachfolgend werden anhand der Figuren Beispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die Reinigung von MspA aus *M. smegmatis* in chromatographischer Darstellung,

Fig. 2 die Reinigung von MspA aus *E. coli* in chromatographischer Darstellung,

Fig. 3 die Konstruktion des Plasmidvektors pMN501,

Fig. 4 eine schematische Ansicht einer Vorrichtung zur Renaturierung und

Fig. 5 ein renaturiertes MspA in chromatographischer Darstellung.

Fig. 1 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *M. smegmatis*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) Extrakt von *M. smegmatis* mit PLD12-Puffer PLD012-Puffer (100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO). (2) 33 µg aufgereinigtes MspA. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Sequenz von MspA, MspA + Promotor sowie MspA mit vermuteter Signalsequenz ist in den Sequenzprotokollen 1 - 3 wiedergeben.

Fig. 2 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *E. coli*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (1) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 vor der Induktion durch IPTG. (2) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 nach der Induktion durch IPTG. (3) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

In Fig. 3 ist schematisch die Konstruktion des Plasmids pMN501 zur Überexpression von MspA in *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

- lacI: Gen codierend für den Laktose-Repressor
 nptI: Gen codierend für die Neomycinphosphotransferase; sie vermittelt Kanamycinresistenz
 5 Ori: Replikationsursprung
 RBS: Ribosomenbindestelle

Fig. 4 zeigt schematisch eine Vorrichtung zur Renaturierung von monomerem MspA. Eine Pipettenspitze aus Polyethylen von 5 cm Länge, dessen unteres Ende nach ca. 2 mm abgeschnitten wurde, wurde mit einer 1.7 %igen Agarose-Lösung (in TAE-Puffer) gefüllt. Eine Bleistiftmine (Typ: Eberhard Faber, 3H) wurde auf eine Länge von 5 cm gekürzt. Ein Polypropylengefäß ohne Deckel wurde mit 60 µl einer Lösung mit 5 µg denaturiertem MspA gefüllt und die Pipettenspitze und die Bleistiftmine in die Lösung gestellt. Dann wurde die Pipettenspitze als Kathode und die Bleistiftmine als Anode angeschlossen.

Fig. 5 zeigt die Renaturierung von denaturiertem MspA. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach (Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166, 368-79 (1987)) getrennt. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) 800 ng denaturiertes MspA (2) 800 ng MspA nach der Renaturierungsreaktion. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

30

Beispiel 1: Aufreinigung von MspA aus *M. smegmatis*.

Zwei Liter 7H9-Medium mit 0.05 % Tween 80 und 0.2 % Glycerin werden mit *M. smegmatis* mc²155 beimpft und 2 Tage bei 37°C geschüttelt (Jacobs, W. R., Jr., Kalpana, G. V., Cirillo, J.

10

D., Pascopella, L., Snapper, S. B., Udani, R. A., Jones, W., Barletta, R. G. and Bloom, B. R. Genetic systems for mycobacteria. *Methods Enzymol* 204, 537-55 (1991)).

5 7.9 g Zellen (Naßgewicht) werden nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 g erhalten und in 28 mL PLD012-Puffer (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO) resuspendiert und 30 Minuten im Wasserbad gekocht. Dieser Rohextrakt wird mit 28 mL Aceton gefällt, der Niederschlag in
10 8 mL ALD012-Puffer Puffer (25 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.12 % LDAO) aufgenommen und über eine G25-Säule mit demselben Puffer entsalzt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt.
15 Natives MspA (100 kDa) eluiert bei 680 mM NaCl. Die Ausbeute beträgt 670 µg MspA mit einer Reinheit von über 90 % (s. Fig. 1).

20 Beispiel 2: Verfahren zur Präparation des Kanalproteins MspA aus E. coli

Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute an MspA wird eine Überexpression des entsprechenden Gens vorgeschlagen. Zunächst wird das *mspA*-Gen kloniert, das für das Kanalprotein MspA aus *Mycobacterium smegmatis* mc²155 kodiert. Es wird das T7-
25 Expressionssystem für die Überexpression des *mspA*-Gens gewählt.

Das *mspA*-Gen wird aus dem Plasmid pPOR6 über PCR amplifiziert. In der nativen *mspA*-Sequenz werden alle Codons verändert, die in stark exprimierten Genen aus *Escherichia coli*
30 selten vorkommen. Im Sequenzprotokoll 4 (siehe unten), sind alle eingeführten Mutationen aufgelistet. Diese *synmspA* genannte DNA wird nach der Methode von Stemmer (Stemmer, W. P.,

11

Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. and Heyneker, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164, 49-53 (1995)) durch Assemblierung von Oligonucleotiden synthetisiert und anstelle des *mspA*-Gens in den Vektor pMN500 eingesetzt. Das resultierende Plasmid pMN501 (Fig.3) vermittelt in Zellen von *E. coli* BL21(DE3) eine starke Expression von denaturiertem MspA-Monomer (20 kDa) nach Induktion mit IPTG. Das so exprimierte MspA kann dem Sequenzprotokoll 5 (siehe unten) entnommen werden

Beispiel 3: Aufreinigung von MspA aus *E. coli*

Ein Liter LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin wird mit *E. coli* BL21(DE3)/pMN500 beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 geschüttelt. Dann wird mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen noch sechs Stunden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2.2 geschüttelt. Die Zellen werden in 40 mL A-Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM NaCl) resuspendiert und durch zehnminütiges Kochen in Wasser aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min abgetrennt. Der Überstand wird an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt. Denaturiertes MspA eluiert bei 350 mM NaCl. Um höhermolekulare Proteine abzutrennen, werden die Fraktionen mit MspA vereinigt und eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ausbeute beträgt 10 mg MspA mit einer Reinheit von über 95 % (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 4: Elektrochemische Assemblierung des Kanalproteins MspA

Durch die Überexpression von MspA in *E. coli* ist es zwar leicht möglich, das Kanalprotein mit einer guten Ausbeute zu isolieren. Das gewonnene Protein liegt zum großen Teil in in-

12

aktiver Form vor. Die Überführung in die aktive Form bzw. Renaturierung von monomerem MspA kann nach folgendem Protokoll erfolgen:

- 5 Die Renaturierung findet in einer speziell für diesen Zweck entwickelten Apparatur statt (Fig. 4). Die Renaturierungsreaktion wird mit 5 µg MspA in monomerer Form in dieser Reaktionsapparatur durch Anlegen einer Spannung von 50 V für 30 min durchgeführt. Zum Schluß wird die Spannung für fünf
10 Sekunden umgepolt, um an der Bleistiftmine adsorbiertes Porin wieder zu lösen.

- Das Protein wird nach der oben beschriebenen Renaturierungsreaktion in einem Proteingel untersucht (s. Fig. 5). Dabei
15 stellt sich heraus, daß ein großer Teil des Proteins zu oligomeren Einheiten assembliert ist. Durch Rekonstitutionsexperimente kann gezeigt werden, daß das MspA in dieser Form wieder hohe Kanalaktivität besitzt. Das beweist, daß die Renaturierung von MspA durch geringe Gleichspannungen möglich ist.

20

Diese Renaturierungsreaktion ist sehr einfach durchzuführen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Präparation von funktionalem Kanalprotein MspA aus überproduzierenden *E. coli*.

13

Liste der Sequenzprotokolle:

1. mspA-Gen, translatiert
- 5 2. mspA-Gen + Promotor, translatiert
3. MspA-Proteins mit vermuteter Signalsequenz
- 10 4. synmspA-Gen, translatiert
5. rMspA-Protein

14
SEQUENZPROTOKOLLE

<110> Niederweis Dr., Michael
Bossmann Dr., Stefan

5 <120> Synthese von Nanostrukturen mit Kanalproteinen

<130> MN01

10 <140>
<141>

<160> 5

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 636
<212> DNA

20 <213> Mycobacterium smegmatis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

25 <223> mspA-Gen

<400> 1

atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg gtt gca gcc atc gcg	48
Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala	
1 5 10 15	
gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca ggc ctg gac aac gag	96
Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu	
20 25 30	
ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc acc gtg cag cag tgg	144
Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp	
35 40 45	
gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac cgc aac cgt ctt acc	192
Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr	
50 55 60	
cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac atc gtg gcc ggc ccc	240
Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro	
65 70 75 80	
ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc ggc tac cag atc ggc	288
Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly	
85 90 95	
ttc ccg tgg tcg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc agc tac acc acc ccg	336
Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro	
100 105 110	
aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct ccg ccg ttc ggc ctg	384
Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu	
115 120 125	
aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt gtg tcg atc tcg gca	432
Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala	
130 135 140	

15

	gat	ctg	ggc	aac	ggc	ccc	ggc	atc	cag	gaa	gtc	gca	acg	ttc	tcg	gtc	480
	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Thr	Phe	Ser	Val	160
	145					150				155							
5	gac	gtc	tcc	ggc	gcc	gag	ggt	ggc	gtg	gcc	gtg	tcg	aac	gcc	cac	ggc	528
	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	His	Gly	175
					165					170							
10	acc	gtg	acc	ggt	ggc	ggc	ggt	gtg	ctg	ctg	cgt	ccg	ttc	gcc	cgc	576	
	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	190
					180					185							
15	ctg	atc	ggc	tcg	acc	ggt	gac	tcg	gtc	acc	acc	tac	ggc	gaa	ccc	tgg	624
	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Pro	Trp	205
			195					200									
	aac	atg	aac	tga													636
	Asn	Met	Asn														
20				210													

16

<210> 2
 <211> 1423
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium smegmatis
 5
 <220>
 <221> -10_signal
 <222> (323)..(328)
 <223> vermuteter Promotor
 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (499)..(1134)
 <223> mspA-Gen
 15
 <220>
 <221> RBS
 <222> (492)..(496)
 <223> vermutete Ribosomenbindestelle
 20
 <400> 2
 gttaacggag tcgggccgtc gatacggcgg cgaagatcat ccggcagatt ggccgcctggg 60
 25
 taaaccccgcg taaacactgg taccgcccgt ccgcgcgcgga aaagggttttg cctcacgggtg 120
 aatattgtgac ctgaattgca cttcacgggt aaaagccggag gtaaccgacg gttgccgcag 180
 caccctcaca gcttgggcca aggtgacgtg tagcgcacgc ctgccgggtgc cggatggcgg 240
 30
 tcaccgcaaa gtgtcaggca ctgccgaaag gtcagtcagc aaacttcact ggggtctgtgg 300
 tgcgaagtgc ggttgtggga cgtatccgtt gctgccgcgc gccctggcgt ttatgtttct 360
 gctgccaaact gtgagcgagg cattagagac agatgtgac ctcttagatc tccgaagtct 420
 35
 ctgaacaggt gttgagccgg ttgcagacaa caaacaggt gggcctgagg ggccgcgcggc 480
 gatacagtta gggagaac atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg 531
 Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met
 1 5 10
 40
 gtt gca gcc atc gcg gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca 579
 Val Ala Ala Ile Ala Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala
 15 20 25
 45
 ggc ctg gac aac gag ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc 627
 Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu
 30 35 40
 50
 acc gtg cag cag tgg gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac 675
 Thr Val Gln Gln Trp Asp Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp
 45 50 55
 55
 cgc aac cgt ctt acc cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac 723
 Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr
 60 65 70 75
 60
 atc gtg gcc ggc ccc ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc 771
 Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu
 80 85 90
 ggc tac cag atc ggc ttc ccg tgg tgg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc 819

17

	Gly	Tyr	Gln	Ile	Gly	Phe	Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Asn	Phe			
									100									105	
5	agc	tac	acc	acc	ccg	aac	atc	ctg	atc	gac	gac	ggc	gac	atc	acc	gct	867		
	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Asp	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala			
									115									120	
10	ccg	ccg	ttc	ggc	ctg	aac	tcg	gtc	atc	acc	ccg	aac	ctg	ttc	ccc	ggc	915		
	Pro	Pro	Phe	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Phe	Pro	Gly			
									130									135	
15	gtg	tcg	atc	tcg	gca	gat	ctg	ggc	aac	ggc	ccc	ggc	atc	cag	gaa	gtc	963		
	Val	Ser	Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Glu	Val			
									145									150	155
20	gca	acg	ttc	tcg	gtc	gac	gtc	tcg	ggc	gcc	gag	ggc	ggc	gtg	gcc	gtg	1011		
	Ala	Thr	Phe	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Val			
									160									165	170
25	tcg	aac	gcc	cac	ggc	acc	gtg	acc	ggc	gcc	ggc	ggc	ggc	gtg	ctg	ctg	1059		
	Ser	Asn	Ala	His	Gly	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Leu			
									175									180	185
30	cgt	ccg	ttc	gcc	cgc	ctg	atc	gcc	tcg	acc	ggc	gac	tcg	gtc	acc	acc	1107		
	Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Thr			
									190									195	200
35	tac	ggc	gaa	ccc	tgg	aac	atg	aac	tga	ttcctggacc	gccgttcggc						1154		
	Tyr	Gly	Glu	Pro	Trp	Asn	Met	Asn											
									205									210	
40	cgctgagacc	gcttgagatc	ggcgcgtccc	gctcccgggtg	tcgtcagctc	atcgttgaca											1214		
	cgtgaactga	cactcttctc	agccggagcg	kacgcgccga	tcttgcttc	tgagcagttc											1274		
	tcagtccgtc	cgcgcgaaca	ccagcgctga	cggcgtacgc	agcctgcccc	ccaccgcgcg											1334		
	ccagggacgc	cccagcctgg	gcaccacctc	agcgttcggc	acgatgcgcg	gatcggtcac											1394		
	ctcgaacgtc	tcaccgttca	tcaccgcgc														1423		

18

<210> 3
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium smegmatis
 5
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(27)
 <223> vermutete Signalsequenz des MspA-Proteins
 10
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (28)..(211)
 <223> reifes MspA-Protein
 15
 <400> 3
 Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala
 1 5 10 15
 20 Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu
 20 25 30
 Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp
 35 40 45
 25 Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr
 50 55 60
 Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro
 65 70 75 80
 Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly
 85 90 95
 35 Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro
 100 105 110
 Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu
 115 120 125
 40 Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala
 130 135 140
 Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val
 145 150 155 160
 Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala Val Ser Asn Ala His Gly
 165 170 175
 50 Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg
 180 185 190
 Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Glu Pro Trp
 195 200 205
 55 Asn Met Asn
 210
 60

19

<210> 4
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

5

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetisch

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(558)
 <223> synmspA-Gen

15

<400> 4
 atg ggc ctg gac aac gaa ctg tcc ctg gtt gac ggc cag gac cgt acc 48
 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr
 1 5 10 15

20

ctg acc gtt cag cag tgg gac acc ttc ctg aac ggt gtt ttc ccg ctg 96
 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu
 20 25 30

25

gac cgt aac cgt ctg acc cgt gaa tgg ttc cac tcc ggt cgt gcg aaa 144
 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys
 35 40 45

30

tac atc gtt gcg ggt ccg ggt gcg gac gag ttc gaa ggt acc ctg gaa 192
 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu
 50 55 60

35

ctg ggt tac cag atc ggc ttc ccg tgg tcc ctg ggt gtt ggt atc aac 240
 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn
 65 70 75 80

40

ttc tct tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc 288
 Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr
 85 90 95

45

gct ccg ccg ttc ggt ctg aac tct gtt atc acc ccg aac ctg ttc ccg 336
 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro
 100 105 110

50

ggt gtt tct atc tct gct gat ctg ggc aac ggt ccg ggt atc cag gaa 384
 Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu
 115 120 125

55

gtt gct acc ttc tct gta gac gtc tct ggt gct gaa ggt ggt gtt gct 432
 Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala
 130 135 140

60

gtt tct aac gct cac ggc acc gtt acc ggt gcg gct ggc ggt gtt ctg 480
 Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu
 145 150 155 160

ctg cgt ccg ttc gct cgt ctg atc gct tct acc ggt gac tct gtt acc 528
 Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr
 165 170 175

acc tac ggt gaa ccg tgg aac atg aac tga 558
 Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
 180 185

20

5 <210> 5
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 10 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(184)
 <223> rMspA
 15 <400> 5
 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu
 20 20 25 30
 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys
 35 40 45
 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu
 25 50 55 60
 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn
 65 70 75 80
 30 Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr
 85 90 95
 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro
 100 105 110
 35 Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu
 115 120 125
 Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala
 40 130 135 140
 Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu
 145 150 155 160
 45 Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr
 165 170 175
 Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
 180 185
 50

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins, wobei das kanalbildende Protein durch heterologe Expression oder durch Aufreinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.
5
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gram-positive Bakterium ein mindestens eine Mycolsäure enthaltendes Bakterium ist.
10
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.
15
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein ein Porin ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist.
20
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil ist.
25
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Porin MspA ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird.
30
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen wird.
35

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird.
- 5 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 benutzt wird.
- 10 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des expimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht.
- 15 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht.
- 20 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression ein mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.
- 25 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 benutzt wird.
- 30 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet wird, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist.

23

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kanalbildenden Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien gewonnen werden.

5

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detergentien aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)_n, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthioglucoside, besonders Octylthioglucosid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauyldiamminoxid.

10

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, beträgt.

15

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Extraktionszeit 5 bis 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt.

20

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Puffer mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat benutzt wird.

25

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei durch heterologe Expression gewonnenes MspA durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert wird.

30

23. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

24. Gen kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien.

25. mspA-Gen gemäß Sequenz 1.
26. Mutiertes mspA-Gen, wobei die Mutation im wesentlichen
5 in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in
E.coli hoch exprimierten Gene besteht.
27. Mutiertes mspA-Gen, insbesondere nach Anspruch 26, wobei
10 die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt
auf weniger als 66% vermindert ist.
28. Mutiertes mspA-Gen, insbesondere nach Anspruch 26 oder
27, abgeleitet von der Sequenz 1, wobei die Mutation so aus-
gebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität so-
15 wie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im we-
sentlichen der von MspA entspricht.
29. Mutiertes mspA-Gen nach einem der Ansprüche 26 bis 28,
wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 ist.
20
30. Plasmidvektor pMN501.
31. Überexpressionssystem, bei dem E.coli den Plasmidvektor
pMN501 enthält.

25

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines bildenden Proteins aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei
5 das kanalbildende Protein durch Expression aus E.coli gewonnen wird.

BEST AVAILABLE COPY

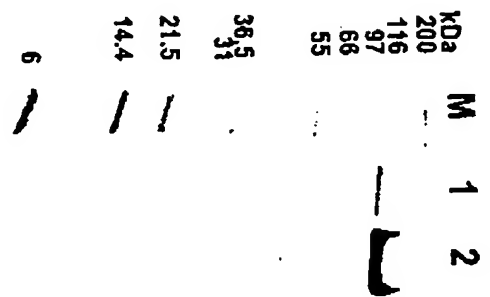


Fig. 1

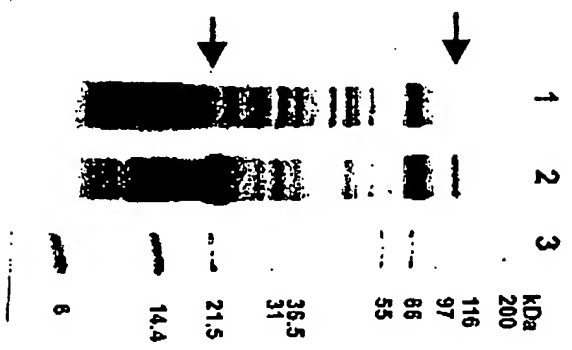


Fig. 2

BEST AVAILABLE COPY

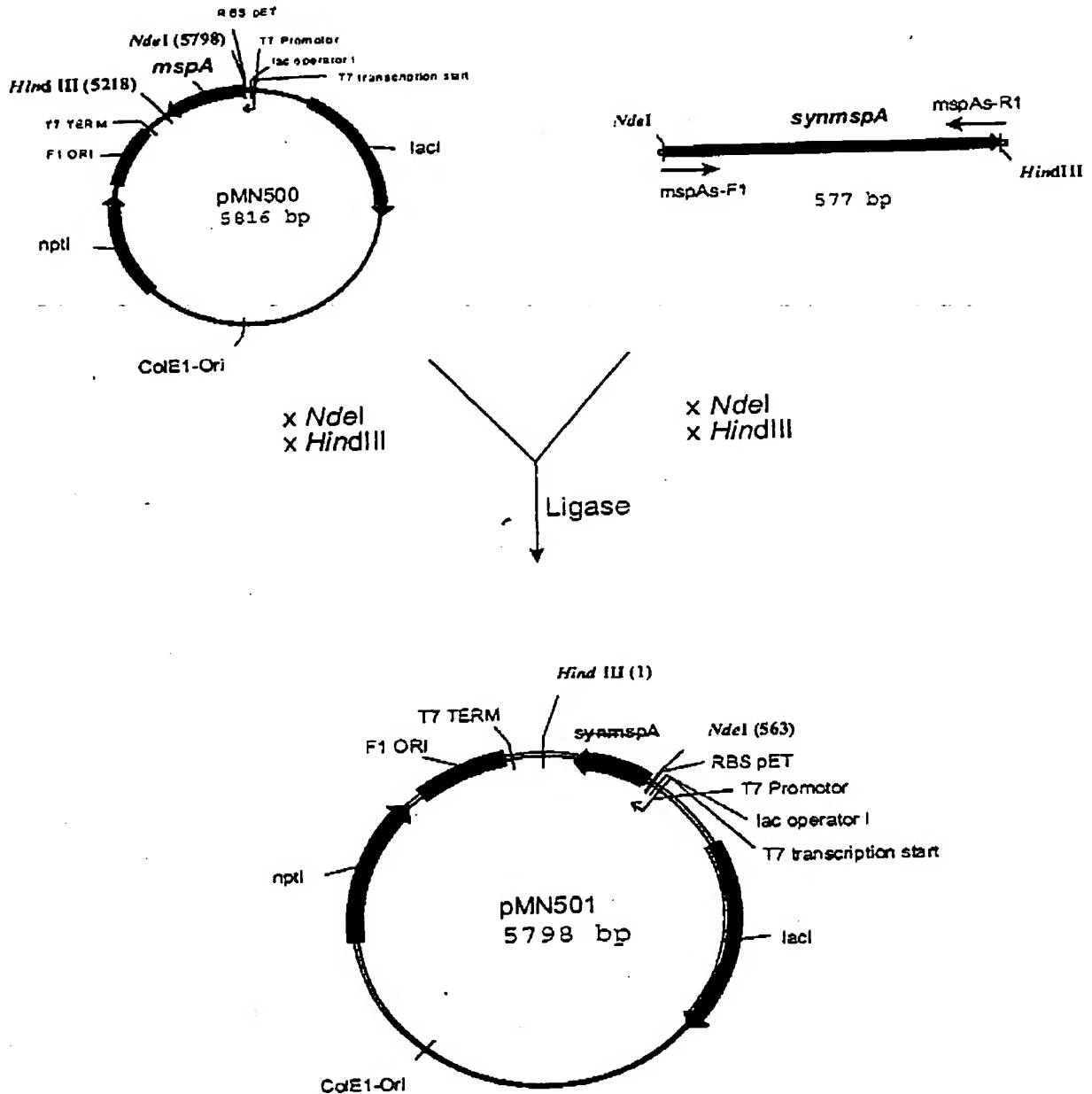


Fig. 3

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5

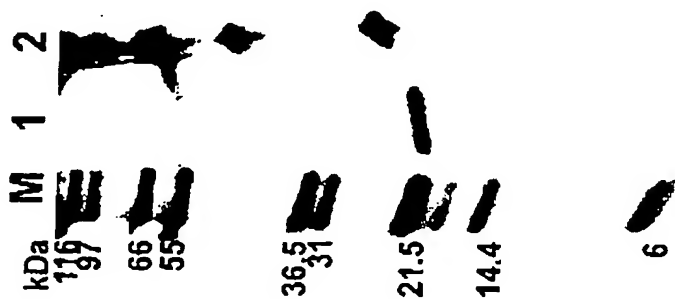
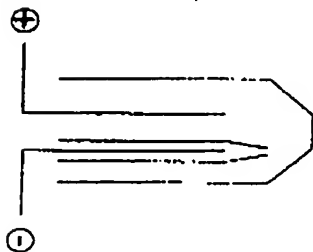


Fig. 4



BEST AVAILABLE COPY

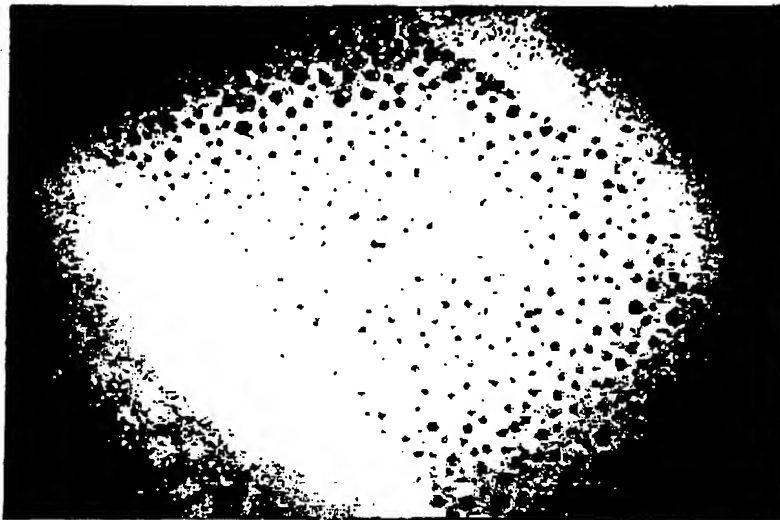


Fig. 6a

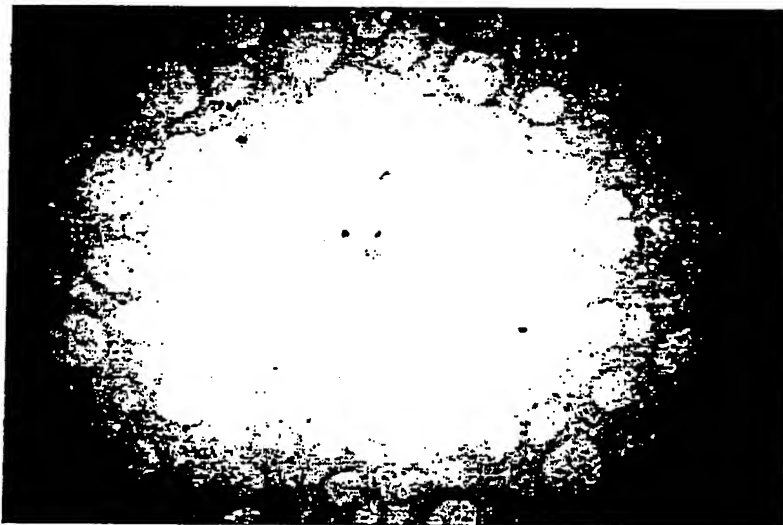


Fig. 6b

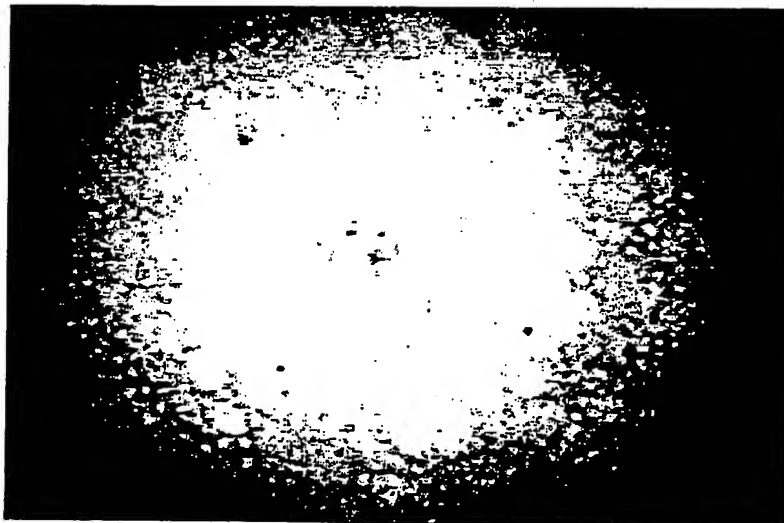


Fig. 6c